

氏名	笹部 美知子		
授与した学位	博 士		
専攻分野の名称	学 術		
学位授与番号	博甲第2285号		
学位授与の日付	平成13年 9月30日		
学位授与の要件	自然科学研究科エネルギー転換科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	植物の過敏感反応誘導機構の解析 - INF1 elicitinにより誘導される防御応答シグナル伝達経路 -		
論文審査委員	教授 白石友紀	教授 稲葉昭次	教授 杉尾 剛

#### 学位論文内容の要旨

多くの *Phytophthora* 属菌により分泌されるエリシチンは、非宿主に対して著しい HR を誘導するタンパク質エリシターとして知られている。大腸菌で発現させた *P. infestans* のエリシチンをタバコ懸濁培養細胞に処理すると、oxidative burst、防御遺伝子の発現と共に、アポトーシス様のゲノム DNA のラダー化を伴う細胞死が誘導された。シグナル伝達系の各種阻害剤を用いてエリシチンによる細胞死と他の防御応答の発現に対する影響を調べた結果、細胞死、oxidative burst はいずれも  $\text{Ca}^{2+}$  を必要とすること、また protein kinase の活性化が防御遺伝子の発現を含む全ての応答に必須であることが示された。しかし、 $\text{O}_2^-$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  等いずれの活性酸素種の生成を抑制しても、細胞死及び防御遺伝子発現には影響を与えなかったこと、細胞死が抑制される系においても防御遺伝子発現は抑制されなかったことなどから、それぞれのシグナル伝達経路は一部同様のシグナル分子の活性化を必要とするものの、かなり上流で分岐した独立した経路であることが示唆された。

また、これらの応答はすべて de novo なタンパク質発現を必要とすることが明らかとなり、これらの防御応答の誘導には新規な遺伝子発現が必要であることが示唆された。そこでこのモデル系に Differential Display 法を適用し、それぞれの防御応答シグナル伝達経路に共通、もしくは特異的に関与する新規な因子の探索を試みた。単離された1つの遺伝子は、バクテリアやカビ、ヒトにおいて高く保存されている ATP binding cassette transporter (ABC トランスポーター) と高い相同性を示し、典型的な防御遺伝子の一つである *PAL* 遺伝子より迅速かつ強力に発現が誘導されることが明らかとなった。さらに本遺伝子 (*NtABC1*) の発現パターンをいくつかのシグナル伝達阻害剤を用いて解析したところ、*NtABC1* は *PAL* 遺伝子と同じ発現挙動を示した。以上の結果より、*NtABC1* はタバコにおける新規防御遺伝子であることが示唆された。

本論文は、病原菌に対する植物の過敏感反応誘導のシグナル伝達経路について、タバコ培養細胞及びジャガイモ疫病菌の生産するタンパク質エリシター-INF1 elicitin（以下エリシチン）を用いて解析したものである。笹部氏は、まず、エリシチンによって誘導される細胞死が動物細胞のプログラム細胞死に相当するか否かを生理生化学的、形態学的に解析し、DNAの断片化、また、新規なタンパク質合成、プロテアーゼ活性、カルシウムイオン等の要求性から、本細胞死が、動物のアポトーシスと類似したプログラム細胞死であることを明らかにした。更にエリシチンにより誘導される過敏感細胞死、活性酸素生成、防御遺伝子の活性化に至るシグナル伝達経路を薬理学的に解析し、1) これら3つの応答にタンパク質のリン酸化と新規なタンパク質合成が必要であること、しかし、2) 細胞死が抑制される系においても防御遺伝子の活性化は阻害されないことや活性酸素生成を抑制しても細胞死や防御遺伝子発現に影響を与えない等の観察から、それぞれの応答はシグナル伝達経路の上流で分岐していることを明らかにした。これらの成果は過敏感反応のシグナル伝達機構を初めて体系的に解析したものであり、Eur. J. Biochem.に公表された。

次ぎに、エリシチンに応答する遺伝子群をDifferential display法によって検索し、新規に誘導される遺伝子として、ABC transporter遺伝子とレクチン様レセプターキナーゼ遺伝子をクローニングした。また、これ以外にも、グルタチオンSトランスフェラーゼやCDC27を始め量的に変動する複数の遺伝子を見い出している。これらの知見は過敏感反応を総合的に把握する上で極めて重要な知見である。同氏は、転写変動が認められた遺伝子がそれぞれ細胞死誘導及び細胞死抑制に関与する2グループへ分類可能であることを示し、エリシチンを受容した植物細胞のうち死に至る細胞と生存する細胞ではシグナル伝達経路が異なり、それぞれの細胞では異なる因子が働いている可能性を提唱した。この仮説は、過敏感反応の過程に死細胞と生細胞が共存しているという細胞学的知見を分子生物学的に説明するものであり、新規性において高く評価できる。以上のことから、本論文は博士（学術）に値する論文であると判定した。